利用表面增强拉曼光谱定量检测植物激素脱落酸

张燕燕[1,2]，李　灿[1,2]，苏　睿[1,2]，李林泽[1,2]，位文涛[1,2]，李保磊[1,2]，胡建东[1,2,3*]

（1. 河南农业大学 机电工程学院,河南郑州 450002；2. 河南省农业激光技术国际联合实验室,河南郑州 450002；3. 小麦玉米作物学国家重点实验室,河南郑州 450002）

摘　要：植物激素脱落酸（Abscisic Acid，ABA）在调控植物生长和发育方面具有重要作用。然而，ABA在植物组织中含量较低，迫切需要快速灵敏的检测方法。本研究建立了一种基于适配体识别和表面增强拉曼光谱（Surface-Enhanced Raman Spectroscopy，SERS）检测的ABA快速、定量检测方法。ABA适配体修饰的纳米金颗粒兼具SERS信号增强和选择性识别等特点，实现了复杂植物样品基质中痕量ABA的快速、灵敏检测。当ABA分子出现时，适配体将与ABA分子特异性结合，结合后的适配体折叠成G-四聚体结构，将ABA分子包裹在四聚体结构内，拉近ABA分子与金纳米颗粒之间的距离，获得增强并稳定的ABA分子SERS信号。在适配体浓度优化的条件下，该方法检测限为0.1μmol/L，线性相关系数R^2=0.9855，重复性相对标准偏差（Relative Standard Deviation，RSD）≤6.71%，且SERS增强基底的稳定性良好（>6个月）。特别是，该方法用于小麦叶片中ABA的检测，检测结果与酶联免疫吸附剂测定（Enzyme Linked Immunosorbent Assay，ELISA）具有良好的吻合度（相对误差≤9.13%）。该研究为植物激素快速检测提供了有效的解决方案。

关键词：脱落酸；适配体识别；表面增强拉曼光谱；金纳米颗粒；生物传感器

中图分类号：Q946.885；O657.37　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**SA202202001

引用格式：张燕燕, 李灿, 苏睿, 李林泽, 位文涛, 李保磊, 胡建东. 利用表面增强拉曼光谱定量检测植物激素脱落酸[J]. 智慧农业(中英文), 2022, 4(1): 121-129.

ZHANG Yanyan, LI Can, SU Rui, LI Linze, WEI Wentao, LI Baolei, HU Jiandong. Quantitative determination of plant hormone abscisic acid using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Smart Agriculture, 2022, 4(1): 121-129. (in Chinese with English abstract)

1　引　言

脱落酸（Abscisic Acid，ABA）是小麦体内的一种内源激素，是小麦生长发育代谢产生的一种有机信号小分子，在极低浓度下，对小麦的生长具有显著的生理效应，在小麦生长过程中起着至关重要的作用[1]。小麦生长的不同阶段不同部位ABA的浓度含量不同，这直接关系到小麦种子的活力、抗倒伏能力、光合性能和抗旱性[2]。由于小麦的ABA浓度较低，大概在

收稿日期：2021-09-17

基金项目：国家自然科学基金项目（32071890，31671581）；国家重点研发计划项目（2017YFD0801204）；国家重点实验室开放课题（30501011）

作者简介：张燕燕（1981—），女，博士研究生，副教授，研究方向为植物激素的光谱检测。E-mail：zyanyan0923@163.com。

*通信作者：胡建东（1965—），男，博士，教授，研究方向为光学生物传感技术。E-mail：jdhu@henau.edu.cn。

0.038～13.2 nmol/L [3]，因此为了定量或监测不同发育期的ABA浓度，实时监测小麦的生长发育状况，恶劣环境对小麦生长的影响，灵敏快速的ABA检测方法非常重要。

截至目前，用于ABA的检测技术主要有比色法（Colorimetric Method）[4]、局部表面等离子体共振（Local Surface Plasmon Resonance，LSPR）[5]、高效液相色谱仪（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）[6]、电化学法（Electrochemical Method）等[7]。这些方法虽然具有足够的准确性，但仍存在样品前处理繁琐、检测成本高、时间长、需要专业操作人员等缺点[8]。因此，有必要建立一种简单、高灵敏度的植物样品中ABA的微量检测方法。

表面增强拉曼光谱（Surface-Enhanced Raman Spectroscopy，SERS）是一种强大的分子振动光谱技术，它可以提供目标分子的特定指纹信息[9-12]。随着传感技术与激光技术的发展，SERS技术已广泛应用于化学分析[13-15]、生物医学成像[16]、环境和食品检测[17]等领域。然而，由于SERS产生“热点”的波动，定量的SERS仍面临一些挑战。产生均匀热点的关键在于利用纳米金或银基底尽可能稳定地增强SERS信号，除了可以通过合成高质量的贵金属纳米颗粒以外，借助于对分析物分子有特殊捕获能力的抗体或者适配体来增强拉曼信号的方法也越发常见[18]。Man等[19]构建了一个通用的生物分子检测平台，将Schizotype适配体与光诱导增强拉曼光谱效应相结合，用于超灵敏检测三磷酸腺苷、可卡因和凝血酶。该研究表明适配体在生物传感方面可以代替抗体来捕获目标分子，适配体结合SERS方法具有较高的灵敏度。Hu等[5]利用适配体结合局域表面等离子共振（Localized Surface Plasmon Resonance，LSPR）的方法对ABA进行了定量研究，结果证明，ABA的适配体对ABA分子有较好的识别能力，可以作为构建ABA生物传感器的识别单元。另外，利用SERS法对ABA的定量研究还处于起步阶段，目前还未发现SERS方法结合适配体的相关文献。

当检测体系中有脱落酸存在时，适配体与脱落酸分子特异性结合，适配体的构象转变为G四聚体样结构，将ABA分子包裹在四聚体结构之间，拉近并固定脱落酸分子与纳米金颗粒之间的距离，使得脱落酸分子的拉曼信号强度稳定且增加。基于这一原理，本研究主要以基于SERS的植物激素ABA定量检测生物传感器为研究对象，以纳米金粒子作为拉曼探针，适配体作为捕获探针修饰在纳米金颗粒上，构建了一种灵敏、快速的适配体传感器并实现对植物激素ABA定量检测。

2 材料与试验方法

2.1 材料和仪器

本试验所用的四氯金酸四水合物（$HAuCl_4$•$4H_2O$）、硝酸银（$AgNO_3$）、L-抗坏血酸（AA）购买于阿拉丁试剂有公司（中国上海）；脱落酸粉末（ABA）、柠檬酸二水合钠（$C_6H_5Na_3O_7$•$2H_2O$）、聚乙二醇山梨糖单月金酸酯（Tween20）购自Sigma-Aldrich（美国）。试验中ABA溶液的配置需要注意，分析天平取0.264 g的ABA粉末用0.5 mL的无水乙醇完全融化，加水定容至10 mL作为母液，密封冷藏；定容后ABA溶液的浓度为100 mmol/L，试验中使用的ABA溶液采用母液加水稀释到使用浓度。脱落酸适配体购买于生工生物工程（上海）股份有限公司，序列号为：HS-5'-ATG GGT TAG GTG GAG GTG GTT ATT CCG GGA ATT CGC CCT AAA TAC GAG CAA C-3' [20]。所有溶液制剂均采用超纯水，使用的玻璃器皿均采用王水［$HCl:HNO_3$=3:1（v/v）］清洗，试验前用超纯水多次冲洗。

合成纳米金颗粒的紫外-可见光谱用紫外可见分光光度计（南京菲勒仪器有限公司，南京，中国）记录。利用透射电子显微镜（JEOL JEM-1400 Plus，Tokyo，Japan）在120 kV加速电压下获得纳米金颗粒的透射电子显微镜（Transmis-

sion Electron Microscope，TEM）图像。离心前用0.05% TWeen20溶液冲洗所有离心管，以防止纳米颗粒吸附在管壁上。SERS信号由共焦拉曼显微系统（先锋科技有限公司，北京，中国）采集。

2.2 纳米金颗粒合成

将装有100 mL、0.01%氯金酸溶液的锥形烧杯置于磁力加热搅拌器上，轻轻搅拌，加热温度设置为120 °C。溶液煮沸后，调节搅拌器为剧烈搅拌模式，同时快速加入1 mL、1%的柠檬酸三钠溶液，10 s后溶液的颜色依次变色为灰、黑、蓝，最后逐渐稳定在紫红色，10 min后关闭热源，继续搅拌溶液至室温，冰箱冷藏待进一步利用。

2.3 适配体修饰纳米金颗粒

将ABA适配体包裹在纳米金颗粒表面制备捕获探针。将浓度为0.12 μmol/L，3 μL活化后的巯基适配体SH-Apt加入到3 mL Au NPs溶液中，室温（25 °C）孵育12 h。以10,000 r/m离心10 min去除未结合的适配体，将沉淀物分散在3 mL的超纯水中备用。

2.4 适配体浓度优化

核酸适配体浓度的大小与捕捉到ABA分子的多少以及检测灵敏度、检测限密切相关，因此，研究了适配体浓度分别在0.04、0.08、0.12和0.16 μmol/L，ABA的浓度分别在1、5和10 mmol/L的条件下，ABA拉曼光谱强度的变化，从而优化出最佳的适配体浓度。

2.5 ABA检测

以适配体修饰的纳米金颗粒为表面增强拉曼的活性捕获基底检测来ABA，将50 μL不同浓度的ABA溶液（1×10^{-7}～1×10^{-4} mol/L）与50 μL的适配体修饰的纳米金颗粒溶液混匀静置30 min后，将10 μL的混合物滴在干净的硅片上，室温干燥后进行SERS检测。拉曼仪器入射激光的功率设置为65 mW，曝光时间为10 s。SERS信号由共焦拉曼显微系统（先锋科技有限公司，北京，中国）采集。拉曼系统包括一个高稳定的暗场显微镜（BX41，奥林巴斯，美国），一个共焦拉曼模块和一个配备CCD （1024×256像素传感器，德国）的高分辨率光谱仪（安道尔科技，英国）。本研究中所有的拉曼光谱均在532 nm激光辐射的10倍物镜下采集。

2.6 方法验证

使用适配体SERS传感器检测ABA的真实样品并与ELISA检测结果做对比。ABA的真实样品提取方法为：取新鲜冻干的小麦叶片1.0 g，液氮研磨后，用2 mL甲醇-水-甲酸（15:4:1，v/v/v）超声提取20 min后放入冰箱冷冻避光24 h，在4 °C条件下10,000 r/min离心10 min，取上清液于4 mL棕色瓶中避光；再次用1 mL甲醇-水-甲酸重复提取2次，合并上清液，30 °C条件下减压蒸发致干，用500 μL甲醇-水-乙酸（1800:200:1，v/v/v）复溶，4 °C条件下10,000 r/min离心10 min后取上清液，待用。

3 结果与讨论

3.1 检测原理

利用SERS结合适配体修饰的纳米金颗粒检测植物激素脱落酸的原理如图1所示，将纳米金颗粒上修饰植物激素脱落酸的巯基适配体（SH-Apt），巯基适配体与纳米金颗粒之间形成Au-S共价键结合。结合在纳米金颗粒外部的适配体随意自然伸长。当体系中有脱落酸存在时，任意分布的脱落酸适配体与ABA结合，伸长的适配体随即折叠为G四聚体，将ABA分子包围在G四聚体中间，这时ABA与纳米金颗粒之间的距离拉近并且距离固定，ABA分子不会随意从纳米金颗粒上脱落下来。离心后，将含有ABA分子的纳米金颗粒溶液进行拉曼检测，由于ABA分子与纳米金颗粒之间距离固定，那么ABA分子所产生的SERS信号也将稳定，从而建

立ABA的浓度与SERS强度之间的定量关系。

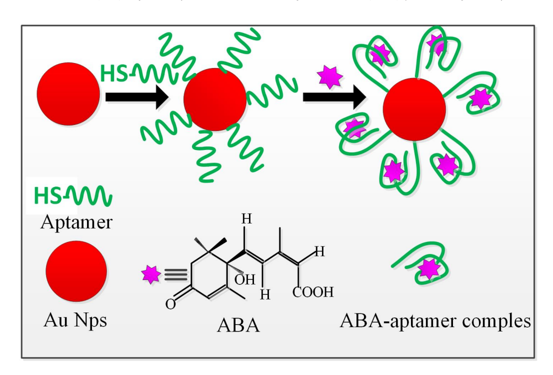


图1 脱落酸SERS适配体传感器的分析原理概况图

Fig. 1 Schematic diagram of construction of abscisic acid SERS aptamer sensor

3.2 纳米金颗粒的表征

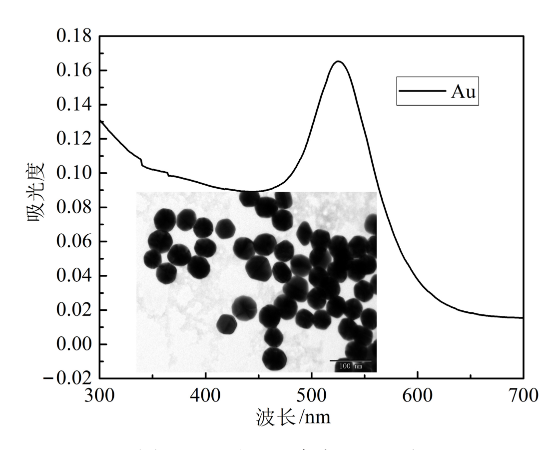
合成的纳米金颗粒的TEM图像如图2（a）所示，从TEM图中可知，合成的纳米金颗粒大小一致，分布均匀，且紫外可见峰位于525 nm左右，峰曲线窄而光滑，说明纳米金颗粒的大小均匀。结合图2（b）可知纳米金颗粒的平均粒径在60 nm左右。

3.3 适配体修饰纳米金颗粒表征

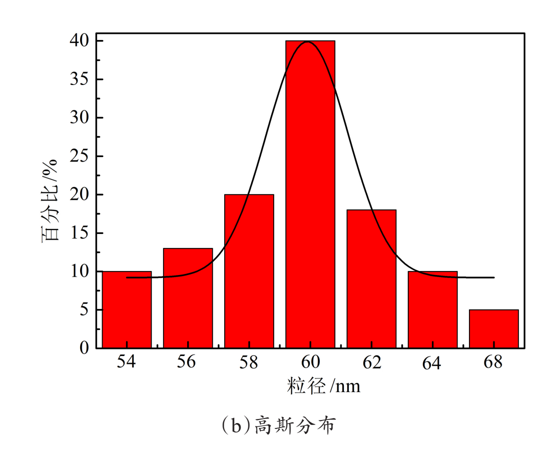
将合成的纳米金颗粒做zeta电势表征，如图3所示。柠檬酸三钠还原的氯金酸溶液生成的纳米金颗粒中含有带负电的柠檬酸根离子，所以纳米金颗粒带负电。Zeta电势表征纳米金颗粒的电势为−26 mW，带巯基的适配体带正电，将适配体修饰在纳米金颗粒上之后，电势为−10.7 mW，说明适配体成功修饰在纳米金颗粒之上。

3.4 适配体浓度优化

当ABA溶液的浓度分别为1、5和10 mmol/L时，未结合适配体的裸金作为增强基底测得的ABA溶液的SERS强度平均值分别为1000、1400和2500。当ABA的浓度为1 mmol/L时，不同浓度的适配体修饰金纳米颗粒后作为增强基底测得的SERS强度的平均值分别为1400、2000、4500和2800；当ABA的浓度为5 mmol/L时，不同浓度适配体修饰纳米金颗粒后作为增强基底测得的



（a）透射电镜图及紫外可见光谱



（b）高斯分布

图2 纳米金颗粒的表征

Fig. 2 Characterization of gold nanoparticles

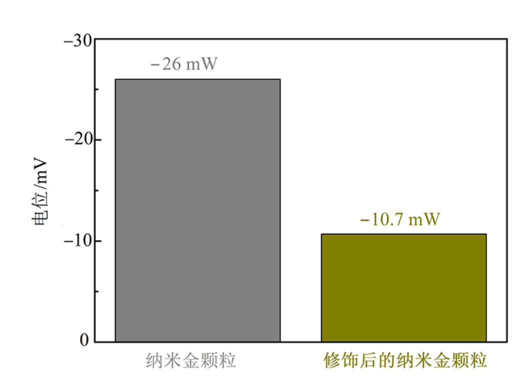


图3 纳米金颗粒上修饰适配体前后的表面电位

Fig. 3 Surface potential before and after modification of the aptamer on gold nanoparticles

SERS强度的平均值分别为2030、3500、6020和4480；当ABA的浓度为10 mmol/L时，不同浓度适配体修饰纳米金颗粒后作为增强基底测得的SERS强度的平均值分别为2520、4680、6120和

6300。将不同浓度的核酸适配体修饰纳米金颗粒后结合ABA分子所得的SERS强度与未修饰适配体的纳米金颗粒作为增强基底所得的SERS强度比值做图（图4）。

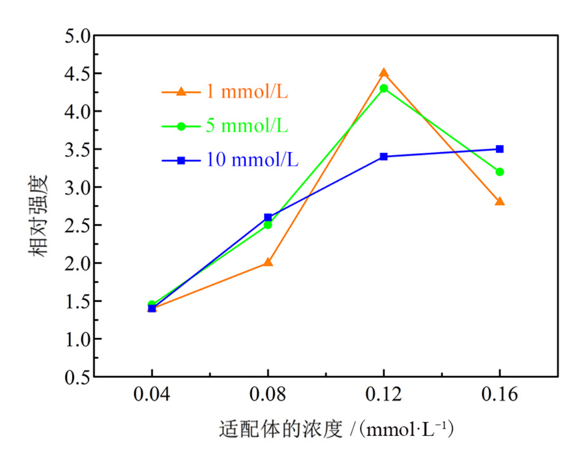


图4　适配体浓度优化曲线

Fig. 4 Optimization curves of aptamer concentration

由图4可见，含有适配体的增强基底所测SERS值与不含适配体的裸金基底所测SERS值的比值逐渐增大，说明随着适配体浓度的增大，捕获的ABA分子增多，相应的SERS信号增强。当适配体浓度达到0.12 μmol/L时，含有适配体的增强基底所测SERS值与不含适配体裸金基底所测SERS值的比值达到最大。当适配体浓度达到0.16 μmol/L时，比值却减小，说明随着适配体浓度的进一步增大，捕获的ABA分子却没有增多，相应的SERS信号也没有增强。这是因为当适配体的浓度大于0.12 μmol/L时，体系中存在多余的适配体会竞争系统中的ABA分子，导致结合在纳米金颗粒上的ABA分子减少，从而SERS强度降低。因此，本试验需用最佳的核酸适配体浓度为0.12 μmol/L。

3.5 ABA的检测

为确认ABA拉曼峰的位置，取购买的ABA粉末在没有增强的情况下的直接采集其拉曼光谱，图5为ABA粉末的拉曼光谱及ABA的分子结构。可见ABA分子信号较强的拉曼峰有4个，分别是1637、1237、1050、615 cm^{-1}，分别对应于ABA分子结构中碳碳双键的伸缩振动、碳碳单键的伸缩振动、甲基的非平面摆动、碳碳单键的外扭式振动[21]。1637 cm^{-1}相对于其他特征峰相对较强，结合ABA分子的结构，1637 cm^{-1}主要来自于碳碳双键和碳碳单键的运动[22]，其中碳碳双键的伸缩振动引起的拉曼散射最为剧烈，所以1637 cm^{-1}可以作为ABA的拉曼特征峰用于植物激素ABA的定性和定量检测。

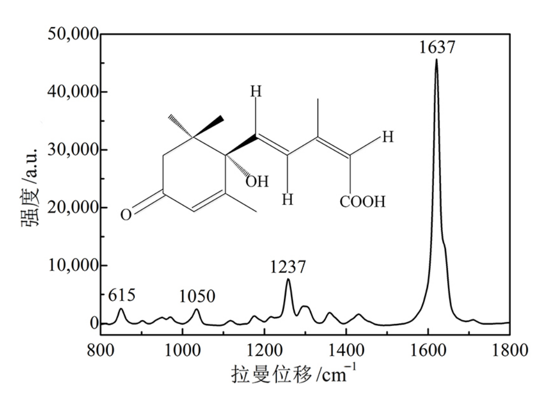


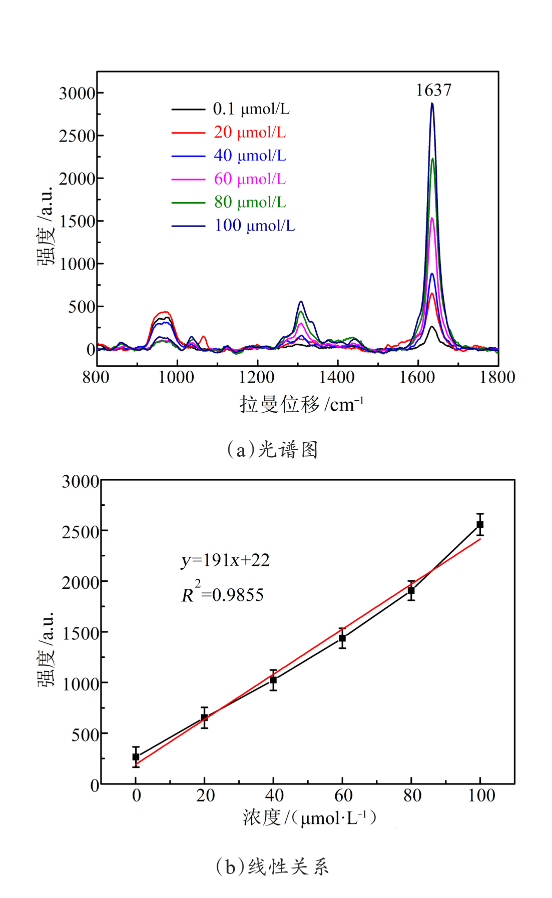
图5　ABA的分子结构及其拉曼光谱

Fig. 5 Molecular structure and Raman spectra of ABA

将不同浓度的ABA标准溶液与适配体修饰的纳米金颗粒混合后，滴在硅片上干燥后进行SERS检测，检测光谱结果如图6（a）所示。此检测方法可以用来检测ABA的浓度，当ABA的浓度为0.1 μmol/L时，也可以很清楚得看到1637 cm^{-1}的特征峰，说明适配体修饰的纳米金颗粒具有很好的检测灵敏度。将ABA的浓度与1637 cm^{-1}特征峰处的SERS强度作出线性关系如图6（b）所示，在0.1～100 μmol/L范围内，R^2=0.9855。

3.6 重复性试验

增强基底的重现性是SERS检测的关键，因此，研究了SERS信号的重复性。在ABA浓度为60 μmol/L条件下，随机在基底上取20个点的SERS强度作为研究对象。在1637 cm^{-1}处的20个随机点的拉曼强度在1575到1608之间波动，拉曼光谱图如图7（a）所示，相应的柱状图如图7（b）所示，相对标准偏差（Relative Standard Deviation，RSD）值为6.71%。一般认为，

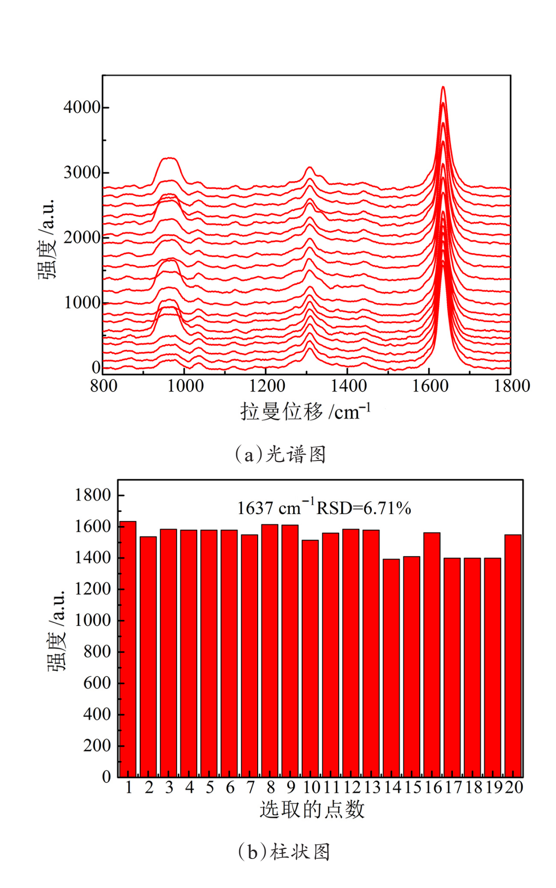


(a)光谱图

(b)线性关系

图 6 适配体修饰的纳米金颗粒作为 SER 基底对 ABA 的检测

Fig. 6 Taking aptamer-modified gold nanoparticles as SERS substrate to detect the different concentrations ABA



(a)光谱图

(b)柱状图

图 7 ABA 浓度为 60 μmol/L 时 SERS 基底的重复性

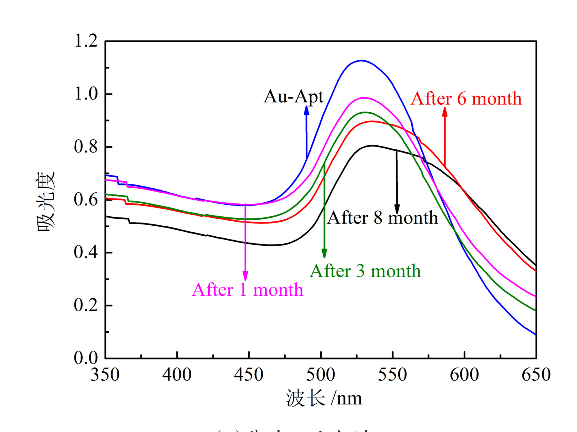
Fig. 7 The repeatability of SERS substrate at ABA concentration of 60 μmol/L

一个新的或现有的 SERS 定量测量体系的重现性 RSD 应小于 20% [23]。说明该适配体修饰的纳米金颗粒 SERS 生物传感器可作为定量测量脱落酸含量的一种分析方法，且为后期研发更为灵敏的、特异性更强的 SERS 生物传感器奠定基础。

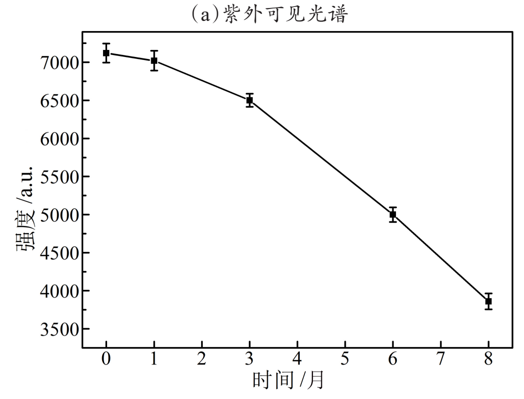
3.7 增强基底稳定性试验

纳米颗粒增强基底的稳定性是适配体 SERS 传感器能够用于实际检测的关键，因此，对纳米颗粒的稳定性进行试验。制备好的适配体修饰的纳米金颗粒在冰箱里 4 ℃保存，分别在 1、3、6 和 8 个月后检测其紫外可见光谱。如图 8（a）可知，适配体修饰的纳米金颗粒在放置 1 个月和 3 个月时，LSPR 峰的位置几乎不变，只是吸光度相应降低。在放置 6 个月之后，LSPR 峰发生红移，但是移动量很小，且吸光度值也发生减小。但是放置 8 个月之后，适配体修饰的纳米金颗粒的 LSPR 峰继续红移，紫外可见光谱变宽，说明纳米金颗粒可能有一定程度聚集。

将放置不同时间的适配体修饰的纳米金颗粒作为增强基底检测 10 mmol/L 的脱落酸溶液，检测结果如 8（b）所示。在放置 1 个月时，ABA 的 SERS 强度几乎不变；放置 3 个月时，ABA 的 SERS 强度减小很小，大约为初始值的 96%；放置 6 个月时，所测得的 ABA 强度的平均值为 5000，大约是初始值的 70%；放置 8 个月时，ABA 的 SERS 强度跟没有修饰适配体的纳米金颗粒的增强性差不多，大约为初始值的 50%。由此可知，适配体修饰的纳米金颗粒作为增强基底检测脱落酸具有较长的保质期，其稳定性超过 6 个月。



（a）紫外可见光谱



（b）SERS强度随时间变化关系

图 8　适配体修饰的纳米金颗粒分别在1、3、6、8个月后的吸光度和SERS增强性

Fig. 8 The absorbance and SERS enhanced performance of AuNPs modified by aptamer after 1，3，6 and 8 months

3.8 真实样品检测

为验证所构建的SERS传感器对真实样品的检测能力，提取成熟期小麦叶片中的ABA，对提取液中ABA含量进行检测，并将其检测结果与酶联免疫吸附测定（Enzyme Linked Immunosorbent Assay，ELISA）检测结果进行对比分析，对比结果如表1所示。将ELISA法与SERS法进行比较，ABA含量的最大相对误差为9.16%，说明两种方法测试的结果具有一致性。

4　结　论

合成高质量的纳米金颗粒，对纳米金颗粒进行紫外和TEM表征。在纳米金颗粒上修饰ABA的巯基适配体作为SERS基底对ABA进行检测，适配体与纳米金颗粒之间形成Au-S共价键结合。

表 1　SERS和ELISA法测定小麦叶片中ABA的试验结果对比（n=5）

Table 1 Comparison of experimental results of ABA determination in wheat leaves using SERS and ELISA（n=5）

样本	SERS/μmol/L	ELISA/μmol/L	相对误差/%
1	13.427	12.367	8.57
2	21.090	19.837	6.32
3	35.480	32.512	9.16

优化适配体的浓度为0.12 μmol/L，在优化的条件下，该生物传感器对ABA的检测浓度可达0.1 μmol/L，在0.1～100 μmol/L范围内，R^2=0.9925，说明该方法的灵敏度较好。对基底上随机选取的20个点进行基底的重现性分析，其RSD值为6.71%，说明该基底的信号重现性较好。另外，该适配体修饰的纳米金颗粒具有良好的稳定性，其寿命超过6个月。最后，提取ABA的真样样品，利用该方法对ABA真实样品试验，并与ELISA检测结果相对比，检测结果最大相对误差为9.16%。

该生物传感器是利用SERS对植物激素检测的探索性研究，研究的结果将对ABA的后续定量和现场检测，以及其他植物激素的检测具有重要的参考价值。

参考文献：

[1] ZHOU Q, ZHANG F, JI S, et al. Abscisic acid accelerates postharvest blueberry fruit softening by promoting cell wall metabolism[J]. Hortic-Amsterdam, 2021, 288: ID 110325.

[2] SHIBATA M, COELHO C, GARIGHAN D, et al. Seed development of Araucaria angustifolia: Plant hormones and germin ability in 2 years of seeds production[J]. New Forests, 2021, 52 (5): 759-775.

[3] SIRKO A, WAWRZYNSKA A, BRZYWCZY J, et al. Control of ABA signaling and crosstalk with other hormones by the selective degradation of pathway components[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22 (9): ID 4638.

[4] ZHOU G, LUO Y, XU Q, et al. Peptide-capped gold nanoparticle for colorimetric immunoassay of conjugated abscisic acid[J]. Acs Applied Materials Interfaces,

2021, 4(9): 5010-5015.

[5] WANG S, ZHANG H, ZEPHANIA B, et al. A multi-channel localized surface plasmon resonance system for absorptiometric determination of abscisic acid by using gold nanoparticles functionalized with a polyadenine-tailed aptamer[J]. Microchimica Acta, 2020, 187 (1): ID 20.

[6] YAN S, GUO L, WU C, et al. Simultaneous determination of three kinds of endogenous hormones content in seeds of post-harvest Yali pear by high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38 (6): 843-847.

[7] LI Y, XIA K, WANG R, et al. An impedance immunosensor for the detection of the phytohormone abscisic acid[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 391 (8): 2869-2874.

[8] FU J, SUN X, WANG J, et al. Progress in quantitative analysis of plant hormones[J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56 (4-5): 355-366.

[9] WANG P, SUN Y, LI X, et al. Recent advances in metal organic frameworks based surface enhanced Raman scattering substrates: Synthesis and applications[J]. Molecules, 3021, 26 (1): ID 209.

[10] DE SOUZA M, OTERO J, LOPEZ-TOCON I. Comparative performance of citrate, borohydride, hydroxylamine and beta-cyclodextrin silver sols for detecting ibuprofen and caffeine pollutants by means of surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Nanoterials, 2020, 10(12): ID 2339.

[11] MOSKOVITS M. Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals[J]. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1978, 69(4): 4159-4162.

[12] MOSKOVITS M. How the localized surface plasmon became linked with surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Notes and Records of the Royal Society, 2012, 66(2): 195-203.

[13] PETTINGER B, WENNING U, WETZEL H. Surface plasmon enhanced Raman scattering frequency and angular resonance of Raman scattered light from Pyridine on Au, Ag and Cu electrodes[J]. Surface Science, 1980, 101(1-3): 409-416.

[14] BOYACK R, LE RU E. Investigation of particle shape and size effects in SERS using T-matrix calculations[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009, 11(34): 7395-7405.

[15] QU L, GENG Y, BAO Z, et al. Silver nanoparticles on cotton swabs for improved surface-enhanced Raman scattering, and its application to the detection of carbaryl [J]. Microchimica Acta, 2016, 183(4): 1307-1313.

[16] LIU J, WHITE I, DEVOE D. Nanoparticle-functionalized porous polymer monolith detection elements for surface-enhanced Raman scattering[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(6): 2119-2124.

[17] MAKAM P, SHILPA R, KANDJANI A, et al. SERS and fluorescence-based ultrasensitive detection of mercury in water[J]. Biosensors Bioelectronics, 2018, 100: 556-564.

[18] LI J, ZHANG Y, DING S, et al. Core-shell nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(7): 5002-5069.

[19] MAN T, LAI W, XIAO M, et al. A versatile biomolecular detection platform based on photo-induced enhanced Raman spectroscopy[J]. Biosensors Bioelectronics, 2019, 147: ID 111742.

[20] GROZIO A, GONZALEZ V, MILLO E, et al. Selection and characterization of single stranded DNA aptamers for the hormone abscisic acid[J]. Nucleic Acid Therapeutics, 2012, 23 (5): 322-331.

[21] 张燕燕, 李冬贤, 马刘正, 等. 植物激素脱落酸分子的光谱与结构研究: 理论与实验[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(9): 2859-2865.
ZHANG Y, LI D, MA L, et al. Spectroscopic and structural studies of plant hormone abscisic acid molecules: Theory and experiment[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2021, 41(9): 2859-2865.

[22] ZHANG Y, ZHANG H, LI D, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for the quantitative detection of abscisic acid in wheat leaves using silver coated gold nanocomposites[J]. Spectroscopy Letters, 2021, 54 (10): 732-741.

[23] ZHOU Z, XIAO R, CHENG S, et al. A universal SERS-label immunoassay for pathogen bacteria detection based on Fe3O4@Au-aptamer separation and antibody-protein a orientation recognition[J]. Analytical Chimica Acta, 2021, 1160: ID 338421.

Quantitative Determination of Plant Hormone Abscisic Acid Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy

ZHANG Yanyan[1,2], LI Can[1,2], SU Rui[1,2], LI Linze[1,2], WEI Wentao[1,2],
LI Baolei[1,2], HU Jiandong[1,2,3*]

（1. *College of Mechanical and Electrical Engineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou* 450002*, China*;
2. *Henan International Joint Laboratory of Agricultural Laser Technology, Zhengzhou* 450002*, China*;
3. *State Key Laboratory of Wheat and Corn Crop Science, Zhengzhou* 450002*, China*）

Abstract: Plant hormone Abscisic Acid (ABA) plays an important role in regulating plant growth. However, the content of ABA in plant tissues is very low, and rapid and sensitive detection methods are urgently needed. In this study, a rapid and quantitative ABA detection method was established based on aptamer recognition and surface-enhanced Raman spectroscop (SERS). The gold nanoparticles modified by ABA aptamer had the characteristics of SERS signal enhancement and selective recognition, realizing the rapid and sensitive detection of trace ABA in complex plant sample matrix. When ABA molecules appeared in detect system, the aptamer would specifically bind with ABA molecules, and the aptamer folded into G-tetrad structure at same time, which wrapped ABA molecules in the tetrad structure, shortened the distance between ABA molecules and gold nanoparticles, and the enhanced and stable ABA molecules SERS signal were obtained. Under the condition of optimized aptamer concentration at 0.12 μmol/L, different concentrations of ABA solutions in the detection system were detected. Within the concentration range of 0.1—100 μmol/L, the SERS intensity of ABA presented a good linear relationship with the concentration. The detection limit of this method was 0.1 μmol/L and the linear correlation coefficient R^2 was 0.9855. The repeatability test of 20 points randomly on SERS substrate showed that the relative standard deviation (RSD) was 6.71%, indicating the stability of SERS substrate was well. Furthermore, the substrate of gold nanoparticles modified by the ABA aptamer terminal with sulfhydryl group (SH-Apt) could be stored in the refrigerator for more than half a year, indicating that the substrate has good stability. Once the preparation of the synthesized SH-Apt modified gold nanoparticles was completed. It could be used on demand without the need to prepare SERS substrate for every detection. In this sense, the constructed aptamer SERS biosensor could realize the rapid and quantitative detection of ABA. The method was used for the determination of ABA in wheat leaves, and the result was in good agreement with the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (The max relative error was 9.13%). This biosensor is an exploratory study on the detection of plant hormones by SERS, and the results of the study will have important reference value for the subsequent quantitative and on-site detection of ABA, as well as the detection of other plant hormones.

Key words: abscisic acid; aptamer recognition; surface-enhanced Raman spectroscopy; gold nanoparticles; biosensor